

虎纹捕鸟蛛毒素 - VI 的分离纯化与鉴定

易庭芳, 胡卫军, 梁宋平¹

(湖南师范大学 生命科学学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 通过离子交换及反相 HPLC, 从虎纹捕鸟蛛毒液中分离得到 1 种新的哺乳类神经毒素, 命名为虎纹捕鸟蛛毒素 - VI (Huwentoxin-VI, HWTX-VI)。MALDI-TOF 质谱仪分析及氨基酸序列分析表明该多肽毒素分子量为 4.440 18 kDa。序列为 H₂N-CIGEG VPCDE NDPRC CGLV VLKKT LHGIW IKSSY CYKCK-COOH。其中 6 个 Cys 形成 3 对二硫键。小鼠脑内注射实验表明, HWTX-VI 对神经系统具有明显的致瘫作用, 这种致瘫作用又具有可逆性。

关键词: 虎纹捕鸟蛛; 神经毒素; 虎纹捕鸟蛛毒素 - VI

中图分类号: Q959.226; Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2002)06-0463-04

Purification and Identification of Huwentoxin-VI, a Neurotoxic Peptide from the Venom of *Selenocosmia huwena*

YI Ting-fang, HU Wei-jun, LIANG Song-ping¹

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: A novel mammal-specific neuron toxin, Huwentoxin-VI (HWTX-VI), was purified from the venom of the spider *Selenocosmia huwena*, by ion exchange chromatography and reversed phase HPLC. The molecular weight of the toxin is 4.440 18 kDa determined by the analysis of MALDI-TOF mass spectrum and the sequence is: H₂N-CIGEG VPCDE NDPRC CGLV VLKKT LHGIW IKSSY CYKCK-COOH determined by the amino sequence analysis, in which six Cys residues form three pairs of disulfide bridge. Rat brain injection experiments show that Huwentoxin-VI has obvious paralysis effect on neuron system and the paralysis effect has reversibility.

Key words: *Selenocosmia huwena*; Neurotoxin; HWTX-VI

虎纹捕鸟蛛 (*Selenocosmia huwena*) 是在云南、广西一带发现的一个捕鸟蛛科新种 (Liang *et al.*, 1993)。其粗毒对小鼠 LD₅₀ 为 1.16 mg/kg, 但对昆虫毒性甚小 (Zhang & Liang, 1993)。粗毒中含有许多生物学活性成分, 其中虎纹捕鸟蛛凝集素 - 1 (SLH-1) 能引起人和小鼠的红细胞凝集。虎纹捕鸟蛛毒素 - I (Huwentoxin I, HWTX-I)、- II、- III、- IV、- V 的一级结构序列和生物学活性已经确定。其中虎纹捕鸟蛛毒素 - I、- II 的空间结构也已经确定 (Liang & Pan, 1995; Liang *et al.*, 1993; Shu & Liang, 1999; Zhang & Liang, 1993)。

通过离子交换及反相 HPLC 分离纯化又从虎纹捕鸟蛛粗毒中得到一种新的毒素——虎纹捕鸟蛛毒素 - VI, 现将这一结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

毒液是由 Liang *et al.* (1995) 从成年雌性虎纹捕鸟蛛螯肢中收集并保存于冰箱中的粗毒。体重为 (23 ± 0.3) g 的昆明小白鼠购于中南大学湘雅医学院。HPLC 所用乙腈 (光谱纯) 购于湖南省化学化工研究院。测序所用的三氟乙酸 (TFA)、正庚烷、

收稿日期: 2002-02-19; 接受日期: 2002-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770158)

1. 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0731-8872556, Fax: 0731-8861304, E-mail: liangsp@public.cs.hn.cn

1-氯代正丁烷、异丙醇、四氢呋喃均购于 Applied Biosystems 公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 HWTX-VI 的分离纯化

HWTX-VI 的分离纯化基本按照本室以前报道 (Shu & Liang, 1999) 的方法进行。反相 HPLC 在 Waters 公司 Alliance 高效液相色谱仪上进行, 并采用 996 二级矩阵检测器和 Vydac C₁₈ 反相柱 (0.39 cm × 30 cm), 层析 A 液: 0.1% TFA; B 液: ACN (0.1% TFA); 检测波长为 254 nm。离子交换 HPLC 在 Waters 650 E 色谱系统上进行, 采用 Protein-Pak CM 8HR 阳离子交换柱 (1.0 cm × 10 cm) 分离。层析用 A 液: 0.2 mol/L Na₂HPO₄; B 液: 0.2 mol/L Na₂HPO₄; C 液: 1 mol/L NaCl; D 液: H₂O。流速为 0.7 mL/min; 洗脱梯度: A, 7%; B, 3%; 0% ~ 90% C 液/0 ~ 50 min; 90% ~ 0% D 液/0 ~ 50 min。检测波长为 280 nm。

1.3 质谱分析

质谱分析在 Bruker 公司 ProFlex III MALDI-TOF 质谱仪上进行。N₂ 激光器, 加速电压 20 kV, 检测电压为 16.5 kV, 激光波长为 337 nm, 阳离子工作模式。基质为 CCA (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) 饱和液, 基质溶解液为 50% 的乙腈和 50% 的溶解有 0.1% TFA 的双蒸水。按 1:20 将样品溶液和基质溶液混合后点样, 室温下自然干燥后进行质谱分析。以 HWTX-I (3.750 45 kDa) 为内标进行校正。

1.4 还原与 Cys 的碘乙酰胺修饰

称取 1 mg HWTX-VI 溶于 1 mL 缓冲液 (0.5 mol/L N-甲基吗啉醋酸盐, pH 8.3), 充 N₂, 加入 1 g 盐酸胍和 14 mg DTT (二硫苏糖醇), 混匀溶解, 再充 N₂, 暗室常温下反应 4 h; 加入 22 mg 碘乙酰胺, 混匀溶解, 充 N₂, 暗室常温下反应 12 h; 加入 3 m LDDH₂O, 反相脱盐。

1.5 氨基酸序列测定

氨基酸序列测定在 Applied Biosystem 491 Pulse-liquid-phase 测序仪上自动进行。苯异内酰硫脲 (PTH) 氨基酸用 PTH C18 柱在 Applied Biosystem 的 140C 分析仪上进行反相 HPLC。

1.6 生物学活性测定

将 12 只小鼠分成 3 组, 每组 4 只, 进行脑内注射实验。一组注射 HWTX-VI 溶液, 一组注射 SLH-I 溶液 (1 mg 虎纹捕鸟蛛凝集素-I 溶于 1 mL K 氏液), 一组注射 K 氏液 (1 mg HWTX-VI 溶于 1

mL K 氏液)。注射剂量均为 5 μ L/只小鼠。连续观察 24 h。膜片钳的电生理实验参考 Peng *et al.* (2001) 的方法进行。

2 结果

2.1 HWTX-VI 的分离纯化

虎纹捕鸟蛛粗毒的典型离子交换色谱图见图 1。保留时间为 6.13 min 的峰的主要成分是虎纹捕鸟蛛凝集素-I (SLH-I); 保留时间为 38.96 min 的峰主要含虎纹捕鸟蛛毒素-I (HWTX-I)。收集保留时间为 3.73 min 的峰进行脱盐反相 HPLC, 分离纯化结果见图 2; 收集保留时间为 10.86 min 的峰并冻干, 后经生物活性测定得知该多肽对哺乳动物具有毒理作用, 并命名为虎纹捕鸟蛛毒素-VI (HWTX-VI)。

2.2 分子量及序列测定结果

修饰前的 HWTX-VI 的 MALDI-TOF 质谱分析图谱见图 3。测得其分子量为 4.440 18 kDa。还原并用碘乙酰胺修饰后的 HWTX-VI 的质谱分析图谱见图 4。测得分子量为 4.788 63 kDa, 修饰前后相差约 348 Da (58 Da × 6, CH₃CONH 基团的分子量为

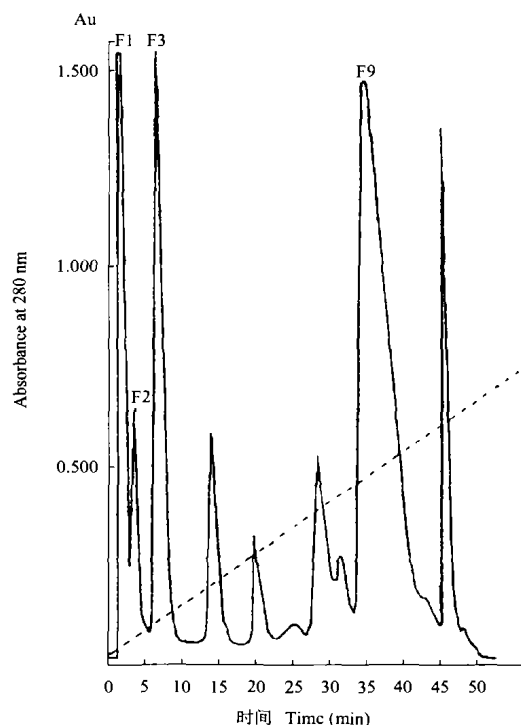


图 1 虎纹捕鸟蛛粗毒的阳离子交换 HPLC 图谱
Fig.1 Ion-exchange HPLC chromatogram of crude venom from *Selenocosmia huwena*

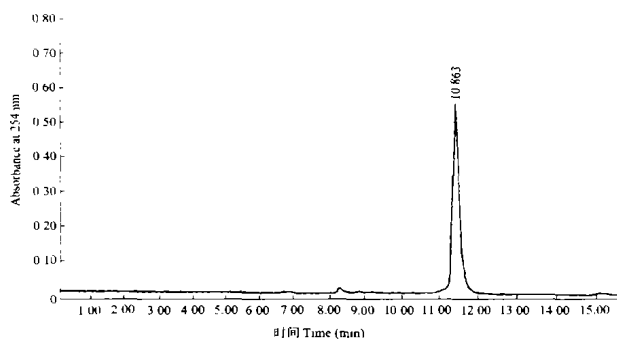


图2 图1中保留时间为3.73 min的峰的反相HPLC图谱

Fig.2 Reverse-phase HPLC chromatogram of 3.73 min fraction of Fig.1

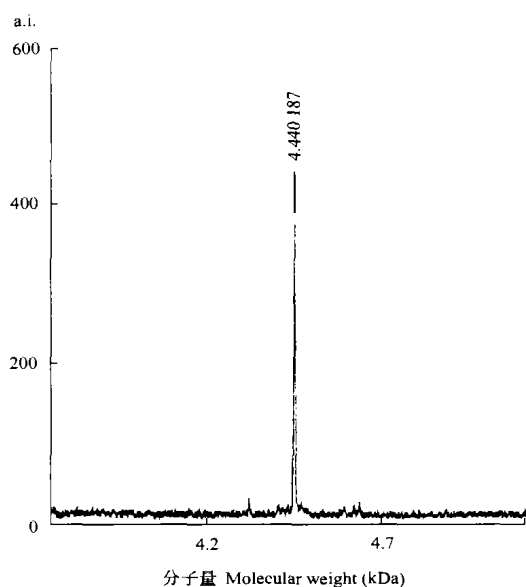


图3 HWTX-VI的MALDI-TOF质谱图谱

Fig.3 MALDI-TOF mass spectrum of HWTX-VI

58 Da), 表明有6个Cys加上了 CH_3CONH 基团。在设置的43个循环中,前40个循环给出信号,后面的3个为空白。氨基酸序列结果确定如下: H_2N -CIGEG VPCDE NDPRC CSGLV VLKKT LHGIW IKSSY CYKCK-COOH。通过该序列计算得理论分子量为4.446 08 kDa。这与质谱所测定的值相差约等于6 Da,表明该多肽分子的6个Cys残基形成了3对二硫键,经搜索SWISS-PROT蛋白质序列库,发现HWTX-VI的氨基酸序列与其他蜘蛛毒素的同源性较小。

2.3 生物学活性分析结果

脑内注射 $5\mu\text{L}$ (1 mg/mL) HWTX-VI溶液后约1.5 min,小鼠出现以后肢为圆心快速旋转,尾无力地平贴地面的后肢瘫痪现象。大约再过1.5 min

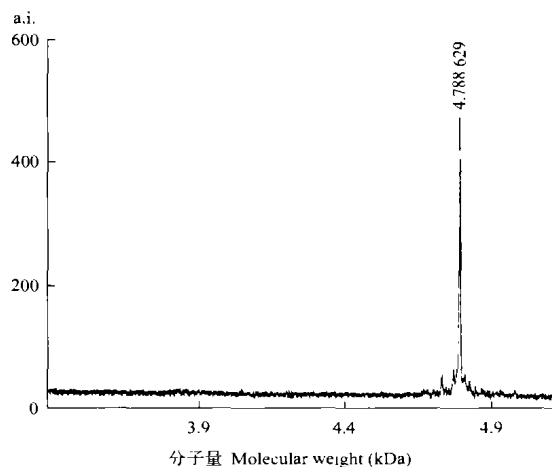


图4 碘乙酰胺修饰后的HWTX-VI的MALDI-TOF质谱图谱

Fig.4 MALDI-TOF mass spectrum of s-carboxymethylated HWTX-VI

后,小鼠呼吸困难,全身瘫痪在地。将其翻转呈腹部朝上后,小鼠依然不动,更不能自动翻回。此时,针刺、热灼鼠尾,小鼠也无反应。20 h后注射HWTX-VI溶液的小鼠又自然恢复正常行走、觅食、翻正反射、刺痛反射、灼痛反射,行为与对照小鼠完全一样。初步膜片钳研究发现该毒素成分对NG-108-15细胞的 Na^+ 电流没有影响。而注射K氏液及SLH-I溶液的小鼠无明显异常现象。

3 讨论

目前已探明包括虎纹捕鸟蛛毒素-I (Huwentoxin-I)在内的多种神经毒和活性肽均含有3对二硫键,其结构框架为三链反平行的 β -折叠及 C_1 - C_4 、 C_2 - C_5 和 C_3 - C_6 的配对方式形成一种抑制剂——胱氨酸结膜体(cystine knot motif)。该结膜体具有较高的保守性,如表1所示前6种含6个Cys残基的多肽神经毒素均形成抑制剂胱氨酸结膜体。其结构框架的相同部分主要由半胱氨酸等保守残基维持,框架上局部区域残基的不同部分决定它们不同的生物学活性(Craik *et al.*, 2001)。由此推测HWTX-VI中的3对二硫键也可能具有这种配对方式。在小鼠脑内注射实验中HWTX-VI对神经系统具有明显的致瘫作用,这种致瘫作用又表现出可逆性,因而小鼠致瘫后的恢复现象有待进一步研究证实。但是可以肯定,HWTX-VI可以作为一种深入了解致瘫神经毒素对机体的分子作用机制的工具,也可作为生物麻醉药的模型分子。

表 1 多肽神经毒素的氨基酸排列顺序及作用位点
Tabel 1 Amino sequence and effect position of neneurotoxic multipeptide

毒素名 Toxin	氨基酸顺序 Amino sequence	残基数 Residue number	生物学活性 Bioactivity	参考文献 Reference
HWTX-I	ACKGVFDCTPGKNECCPNRVCSDKHKWCKWKL	33	钙离子通道 Ca ²⁺ channel	Liang <i>et al.</i> , 1993
HWTX-II	LFECFSFCEI/QEKEGDKPCKKKCKGKWCKFNMCKV	37	与 HWTX-I 有协同作用 Cooperate with HWTX-I	Zhang & Liang, 1993
HWTX-III	DCAGYMRECKEKLCCSGYVCSRWKVCVLPAPW	33	使大鼠输精管收缩加强 Enhance the contractions of rat vas deferens smooth muscle	Liang & Pan, 1995
HWTX-IV	ECLEIFKACNPSNDQCKSSKLVCSRKTRWCKYQI	35	钠离子通道 Na ⁺ channel	Shu & Liang, 1999
HPTx ₁	DCGTIWHYCGTDQSECCEGWKCSRQLCKYVIDW	33	钾离子通道 K ⁺ channel	Grishin, 1999; Maf- ila <i>et al.</i> , 1999
PaTx-I	YCQKWMWTCDSARKCCEGLVCRLWCKKII	29	钾离子通道 K ⁺ channel	Norton & Pallaghy, 1998
HWTX-VI	CIGEGVPCDENDPRCCSGLVVLKKTTLHGIWIKSSYCYKCK	40	有哺乳类神经致瘫作用 Reversibly paralyze animal nerve	

蜘蛛在其捕猎过程中,大部分猎物并不是马上被吞食,而是以蛛丝包裹,在巢中慢慢食用。热带、亚热带地区的大多数蜘蛛具有昆虫非致死或可恢复性麻痹的神经毒素,一旦注入猎物,在潮湿而炎热的环境下,就可以防止猎物迅速腐烂,这可能是蜘蛛长期进化的结果(Mafila *et al.*, 1999; Norton & Pallaghy, 1998)。虎纹捕鸟蛛穴居于地下,

昼伏夜出,以蛙类、小型动物为食(Liang & Pan, 1995)。其捕猎过程中不用蛛网捕食,也不将猎物用蛛丝缠绕,而是在一定的时间内吞食猎物(Liang *et al.*, 1993)。可恢复的瘫痪毒素可使猎物的新陈代谢在一段时间内降低水平,形成天然的“冰箱”,这对虎纹捕鸟蛛具有特殊的意义。

参考文献:

- Craik D J, Daly N L, Waite C. 2001. The Cysteine knot motif in toxins and implications for drug design [J]. *Toxicon*, **36**: 1573 - 1583.
- Grishin E V. 1999. Polypeptide neurotoxins from the spider venoms [J]. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 276 - 280.
- Liang S P, Pan X. 1995. A lectin-like peptide isolated from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* [J]. *Toxicon*, **33**: 875 - 882.
- Liang S P, Zhang D Y, Pan X, *et al.* 1993. Properties and amino acid sequence of Huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* [J]. *Toxicon*, **31**: 969 - 978.
- Mafila R A, Figueiredo D G, Diniz C R, *et al.* 1999. PhTx4, a new class of toxins from phoneutria nigriventer spider venom, inhibits the glutamate uptake in rat brains synaptosomes [J]. *Brain Res.*, **831**: 297 - 300.
- Norton R S, Pallaghy P K. 1998. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides [J]. *Toxicon*, **39**: 43 - 60.
- Peng K, Chen X D, Liang S P. 2001. The effect of Huwentoxin-I on Ca²⁺ channels in differentiated NG108 - 15 cells, a patch-clamp study [J]. *Toxicon*, **39**: 491 - 498.
- Shu Q, Liang S P. 1999. Purification and characterization of Huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* [J]. *J. Pept. Res.*, **53**: 486 - 491.
- Zhang D Y, Liang S P. 1993. Assignment of the three disulfide bridges of Huwentoxin-I, a neurotoxin from the spider *Selenocosmia huwena* [J]. *J. Protein Chem.*, **12** (6): 735 - 741.